รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเตรียมแอนตีบอดีต่อเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์ เอ ซินเทส ในน้ำยางพาราและการประยุกต์ใช้

Preparation of Antibody against 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis* and its possible application

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 157495

BIB Key 143703

เลขหมู่ QK898.E58 964

เลขทะเบียน 2540 ฉ

22 มิ.ย. 2541

ทุนงบประมาณปี 2539 - 2540

บทคัดย่อ

การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG CoA synthase ซึ่งสังเคราะห์ Hydroxymethyl glutaryl Coenzyme A จาก acetyl CoA และ acetoacetyl CoA ในยางพาราที่ศึกษาโดยวิธีใช้สารกัมมันตรังสี ^{14}C acetyl CoA ช่วยติดตามดูปฏิกิริยาการเกิด Hydroxymethyl glutaryl Coenzyme Aพบว่า เมื่อแยกน้ำยางพาราออกเป็นส่วนๆ จะพบเอนไซม์ในส่วนของ C-serum และส่วนก้นหลอด (bottom fraction) โดยเอนไซม์นี้ในส่วนของ C-serum มีมากกว่าในส่วนอื่นๆ

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีทางชีวเคมี เช่นใช้ CM -cellulose จับโปรตีนอื่นๆ ออกไป และใช้ Gel Filtration Chromatography และ DEAE Ion Exchange Chromatography พบว่าสามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้นแต่ไม่มากนัก หากนำเอนไซ์นี้ไปแยกโดยใช้ กระแสไฟฟ้า โดย Polyacrylamide Gel Electrophoresis แล้วนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดย SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis จะพบว่าเอนไซม์นี้ค่อนข้างบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุล 44,700 ดัลตัน แต่หากหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ โดยวิธี Gel Filtration และติดตาม activity ของเอนไซม์ จะพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 54,900 ดัลตัน เอนไซม์นี้เสียสภาพทางธรรมชาติได้ง่าย เอนไซม์ที่ได้จากการตัดเจลภายหลังการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis เมื่อนำไปหาค่า pI โดยวิธี Isoelectrofocusing พบว่ามีค่า pI 4.6

เมื่อทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดเจลที่ได้จาก Polyacrylamide Gel Electrophoresis หลายๆครั้ง มารวมกันเพื่อให้ได้ปริมาณเพียงพอ ที่จะนำไปใช้ในการฉีดเพื่อสร้างแอนตีบอดีต่อเอนไซม์ในหนูและกระต่าย ตรวจสอบแอนตีบอดีที่เกิดขึ้นในซีรั่มของหนู และของกระต่ายโดยวิธี Ouchterlony Immuno diffusion พบว่าทั้งหนูและกระต่ายสามารถสร้างแอนตีบอดีต่อเอนไซม์ทั้งคู่

สำหรับการนำแอนตีบอดีต่อเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ พบว่าสามารถนำแอนตีบอดีนี้ไปตรวจสอบหาเอนไซม์ในตัวอย่างจากด้นยางพารา ในส่วนของ C-serum และส่วนก้นหลอดของน้ำยางพาราได้ โดยวิธี Western Blot ส่วนการนำแอนตีบอดี ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ เอนไซม์ในตัวอย่างจากยางพารา มีแนวโน้มที่จะให้ผลดี แต่ยังต้องการเวลาที่จะศึกษาและปรับปรุงวิธีการ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อไป

Abstract

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) activity in rubber (*Hevea brasiliensis*) latex and in fractions obtained by centrifugation was determined using a radiochemical method. The enzyme was found in both C-serum and bottom fraction but most was in the C-seum.

Purification of HMG CoA synthase from C-serum was performed using general biochemical procedure such as CM cellulose, gel filtration chromatography, and DEAE cellulose chromatography resulted in removal of other proteins. However, the enzyme was only partially purified and the specific activity was not increased as much as it should be. Purified enzyme could only be obtained by extracting the enzymatic active band from non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The molecular weight of the enzyme determined using SDS-PAGE was 44,700 dalton whereas the molecular weight obtained from gel filtration was 54,900 dalton. The enzyme has isoelectric point of 4.6 as determined using isoelectrofocusing.

The enzyme extracted from non-denaturating PAGE prepared from several preparations were pooled. The pooled HMG CoA synthase was used to raise antibody against the enzyme in rat and rabbit. The presence of antibody formed in rat and rabbit serum was checked using Ouchterlony immunodiffusion.

The antibody against the enzyme was collected from rabbit serum and used for detecting the presence of the enzyme in *Hevea brasiliensis* samples such as in C-serum and in bottom fraction using Western Blot technique. Application of the antibody formed in determining the amount of the enzyme in various concentration of C-serum using enzyme-linked immunosorbent assay appeared to be possible. Further investigation on suitable conditions has to be done in order to obtain workable recipe for practical application.